381—385　　11105(15

动 物 学 研 究 1992, 13(4):381—385　　ISSN 0254—5853
Zoological Research　　CN 53—1040/Q

浙江蝮蛇蛇毒蛋白水解酶(蛋白酶a)的酶学性质及生物学活性研究

张东蕾* 王起振 陈建智
(沈阳药学院生化教研室 110015)

摘要 应用离子交换及凝胶柱层析，从浙江蝮蛇（*Agkistrodon halys* Pallas）蛇毒中分离纯化出一种具有酪蛋白水解活性的蛋白酶a。经研究表明，以酪蛋白为底物，该蛋白酶a作用的最适pH值为9.5，最适温度为45℃，Km值为1.33×10^{-5}mol/L，酶活性受EDTA抑制。蛋白酶a不水解TAME，BAEE等精氨酸脂。实验表明，蛋白酶a具有纤维蛋白溶解作用而无出血毒性，EDTA和半胱氨酸可抑制其纤溶活性。

关键词：蝮蛇蛇毒，蛋白酶a，酶学性质，生物学活性　蝮蛇，蛇毒，蛋白酶

材 料 和 方 法

一、材料

1.蛋白酶　按前文（张东蕾，待发表）方法，将浙江蝮蛇（*Agkistrodon halys* Pallas）蛇毒进行4步柱层析分离，得到电泳纯的蛋白酶a。

2.试剂　酪蛋白系中国医药公司北京公司产品，半胱氨酸（生化试剂）系上海康达氨基酸厂生产，对甲苯磺酰-L-精氨酸甲酯（TAME）系中国科学院上海生物化学研究所东风试剂厂生产，苯甲酰-L-精氨酸乙酯（BAEE）系E. Merck Darmstadt公司产品。其他试剂均为国产分析纯试剂。

二、方法

1.蛋白水解酶活力测定　参照云南省动物研究所第四室（1976）方法测定，方法如下：取蛇毒溶液（配在0.01mol/L, pH 7.5Tris-HCl缓冲液中）1毫升，加入2%热变性的酪蛋白溶液（配在0.01mol/L，pH 7.5Tris-HCl缓冲液中）5毫升，在37℃保温15分钟（根据蛋白水解酶活力的大小，也可延长或缩短反应时间），加入5毫升5%的三氯醋酸停止反应，放置20分钟后过滤。取滤液1毫升，加入0.5N NaoH溶液2毫升，1：3稀释的Folin试剂1毫升，于37℃放置20分钟后在660nm处进行比色，测定酪氨酸的生成量。

2.精氨酸酯酶活力测定　参照徐淑华（1984）方法测定。

---

* 现在白求恩医科大学（长春130021）基础医学院，生化教研室工作。

本文1991年9月11日收到，1992年4月23日修回。

3.纤维蛋白溶解作用 参照刘广芬等（1980）方法测定。取家兔枸橼酸钠血浆0.1毫升，加入2.5×10^{-2}mol/L $CaCl_2$溶液0.1毫升，待纤维蛋白凝块形成后，加入0.2毫升样品于凝块上，置37℃保温24小时，观察凝块有无溶解。若凝块溶解，则表明样品具有纤溶酶活性。

4.出血毒性实验 参考张洪基等（1980）方法测定。重约200克的大白鼠，用乙醚麻醉后，在背部选4个点，每点皮内注射0.2毫升样品。每只大白鼠均同时注入生理盐水作阴性对照，注入浙江蝮蛇毒粗毒溶液（用生理盐水配制）作阳性对照，蛋白酶a溶液（用生理盐水配制）分别注入2点。24小时后，将大白鼠乙醚麻醉处死，剥皮观察注射部位是否有出血斑点，若有出血斑点，表明试样具有出血毒性，斑点愈大，则毒性愈强。

结 果

一、蛋白酶a的酶学性质

1.最适pH 以酪蛋白为底物，蛋白水解酶活力测定见方法1，蛋白酶a配在不同pH值的0.01mol/L Tris-HCl缓冲液中，测定蛋白酶a的最适pH值，曲线呈钟形，在pH9.5左右，酶反应活力最高，见图1。

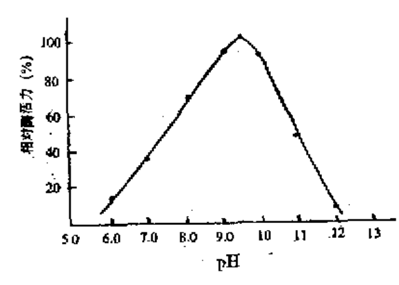


图1 pH对蛋白酶a活性的影响
Fig. 1 Effect of pH on proteinase a activity

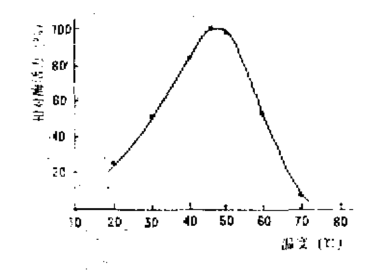


图2 温度对蛋白酶a活性的影响
Fig. 2 Effect of temperature on proteinase a activity

2.最适温度及热稳定性 以酪蛋白为底物，蛋白水解酶活力测定见方法1，蛋白酶a配在pH 9.0，0.01mol/L Tris-HCl缓冲液中，测得蛋白酶a的温度-酶活力曲线如图2所示，其最适温度在45℃，80℃保温20分钟，酶活性完全丧失。

3.底物专一性 蛋白酶a除能水解酪蛋白外，还具有纤维蛋白溶解作用（见后面生物学活性实验），但不作用于TAME，BAEE等精氨酸酯。

4. Km和Vm的测定 按Lineweaver-Burk双倒数作图法，在37℃下，酪蛋白浓度为$0.133—1.33\times10^{-4}$ mol/L（溶于0.05mol/L，pH9.0 Tris-HCl缓冲液中），加入35微克蛋白酶a测得蛋白酶a对酪蛋白的米氏常数Km和最大反应速度Vm值分别为$Km=1.33\times10^{-5}$mol/L Vm＝51.3微克分子/分钟（见图3）。

5. EDTA对蛋白酶a活性的影响 以酪蛋白为底物，蛋白水解酶活力测定见方法1，蛋白酶a浓度为0.06毫克/毫升（内含不同浓度的EDTA，配在pH9.0，0.01mol/L

Tris-HCl缓冲液中），在45℃下，反应20分钟，测得EDTA对蛋白酶 a 的抑制曲线（见图 4）。

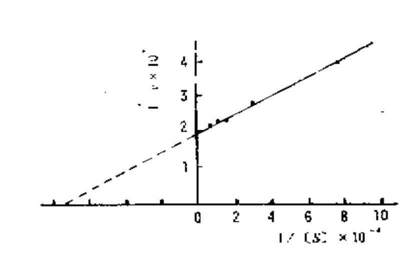


图 3　蛋白酶 a 的反应速度对底物酪蛋白浓度的双倒数作图

Fig. 3　The double reciprocal figure of proteinase a reaction velocity to the substrate (casein) concentration

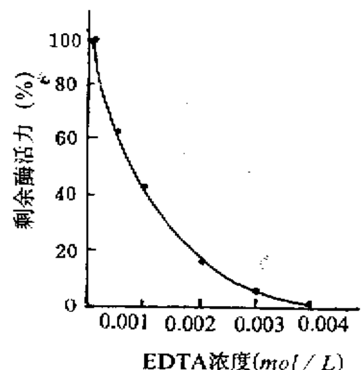


图 4　EDTA 对蛋白酶 a 活性的影响

Fig. 4　Effect of EDTA on proteinase a activity

6.金属离子对蛋白酶 a 活性的影响　以酪蛋白为底物，蛋白水解酶活力测定见方法 1，蛋白酶 a 浓度为 1 毫克/毫升（内含0.05mol/L金属离子，配在pH7.0，0.01mol/L Tris-HCl 缓冲液中），温度为45℃，反应20分钟，测得某些金属离子对蛋白酶 a 活性的影响见表 1。由表 1 可知：Mg^{2+} 对酶活性有明显的激活作用，Ca^{2+} 的作用不明显，而 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 则有明显的抑制作用。

表 1　金属离子对蛋白酶a活性的影响

Tab. 1　Effect of metal ions on proteinase a activity

金属离子(0.05mol/L)	无金属离子	$MgCl_2$	$CaCl_2$	$CuSO_4$	$ZnSO_4$
相对酶活力(%)	100	125	96	74	62

二、蛋白酶 a 的生物学活性

1.纤维蛋白溶解作用　以生理盐水做阴性对照，2 毫克/毫升的浙江蝮蛇毒溶液（用生理盐水配制）做阳性对照，蛋白酶 a 的浓度为0.3毫克/毫升（用生理盐水配制），纤维蛋白溶解实验见方法 3，每组样品同时做 4 份，结果测得蛋白酶 a 具有纤维蛋白溶解作用，即具有纤溶酶活性。

当蛋白酶 a 浓度为0.3毫克/毫升时，2.0×10^{-2}mol/L EDTA及5.0×10^{-2}mol/L 半胱氨酸均可完全抑制其纤溶活性。



图 5　蛋白酶 a 出血毒性实验结果

Fig. 5　The picture of hemorrhagic activity experiment of proteinase a

注射部位：①生理盐水　②粗毒　③④蛋白酶 a

2.出血毒性　取 6 只大白鼠，体重在200—230克之间，雌雄各半，按文献（张洪基，1980）的给药剂量，

粗毒及蛋白酶a的给药剂量均为0.63μg/g，结果测得注射粗毒部位有一个平均直径为10毫米左右的出血斑点，而注射蛋白酶a的部位无任何出血斑点（见图5）。将给药剂量增大到1.0μg/g，注射蛋白酶a的部位也不见任何出血斑点，故可认为蛋白酶a不具有出血毒性。

讨 论

作者应用DEAE-Sephadex A-50、Sephadex G-75、Sephadex G-200和QAE-Sephadex A-25 4步柱层析从浙江产蝮蛇蛇毒中分离纯化出一种具有酪蛋白水解活性的蛋白水解酶，称之为蛋白酶a。通过对蛋白酶a的性质研究得知，蛋白酶a是一分子量为68000，等电点为6.4的偏酸性糖蛋白。其紫外吸收光谱表明，在277nm波长处有最大吸收，$E_{277nm}^{0.1\%}=0.681$。以酪蛋白为底物，其作用最适pH值在9.5，最适温度为45℃，对热较稳定，80℃保温20分钟酶活性完全丧失。$Km=1.33\times10^{-5}mol/L$，EDTA可抑制其蛋白水解酶活性及纤溶酶活性，这表明它是一个金属蛋白酶。此外，Mg^{2+}对蛋白酶a有激活作用，而Cu^{2+}和Zn^{2+}对其均有不同程度的抑制作用。氨基酸组成分析表明蛋白酶a含有较多的天冬氨酸、谷氨酸和赖氨酸。蛋白酶a具有纤溶酶活性，但无出血毒性。

蛋白酶a的理化性质、酶学性质同其它种类蝮蛇毒中的蛋白水解酶的性质很相似。其分子量、等电点、作用的最适pH值，热稳定性及氨基酸组成等与日本蝮蛇毒中的蛋白酶a非常接近（Oshima等，1968）。

由于蛋白酶a还具有纤维蛋白溶解作用，所以从另一个角度也可以说，我们从浙江产蝮蛇毒中分离纯化出一种纤维蛋白溶酶（即蛋白酶a）纯化出的这种纤溶酶同台湾尖吻蝮蛇毒中的纤溶酶（Ouyang等，1976）相比，其分子量和等电点不同，但分子中都含有丰富的天冬氨酸及谷氨酸，作用的最适pH值都大于7，都能水解酪蛋白，而不水解TAME等精氨酸酯。此外，其纤溶活性及酪蛋白水解活性均受EDTA抑制，但纯化出的这种纤溶酶无出血毒性。

参 考 文 献

云南动物研究所第四室。1976。我国几种常见毒蛇的蛇毒酶活力测定。生物化学与生物物理学报，8(2)：151。

刘广芬等。1980。福建产尖吻蝮蛇（*Agkistrodon acutus*）蛇毒的柱层析分离及活力和某些生理效应的测定。动物学研究，1(1)：107。

张洪基等。1980。尖吻蝮（*Agkistrodon acutus*）蛇毒的分离及其生物活性的研究。动物学研究，1(2)：157。

徐淑华，任永忠。1984。江西蝮蛇毒纤溶酶的纯化和性质的研究。中国医科大学学报，13(6)：34。

Oshima, G. *et al*. 1968. Studies on snake venoms purification and some physicochemical properties of proteinase a and c from the venom of *Agkistrodon halys blomhoffii*. *J. Biochem* (Tokyo), 64(2): 227.

Ouyang, C. *et al*. 1976. Purification and characterization of the fibrinolytic principle of *Agkistrodon acutus* venom. *Biochim, Biophy. Acta*, 439(1): 146.

ENZYMATIC PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF A PROTEOLYTIC ENZYME (PROTEINASE A) FROM THE VENOM OF *Agkistrodon Halys* PALLAS

Zhang Donglei　Wang Qizheng　Cheng Jianzhi

(*The department of biochemistry in Shenyang college of pharmacy* 110015)

A proteolytic enzyme from the venom of *Agkistrodon halys* Pallas has been purified by ion-exchang chromatography and by gel-filtration. This proteolytic enzyme (called proteinase a) can hydrolyze casein. Using casein as the substrate, the optimum pH is about 9.5, the optimum temperature is about 45℃, and $Km = 1.33 \times 10^{-5}$ mol/L. Its activity toward casein was inhibited by EDTA. It did not act on TAME and BAEE. Proteinase a showed fibrinolytic activity in vitro, EDTA and cysteine could inhibite this activity.

Key words: *Agkistrodon halys* Pallas, Proteinase a, Enzymatic properties, Biological activities